(مقاله پژوهشی)

مقایسه روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن با سایر روش های فنوتیپی و مولکولی در شناسائی استافیلوکوکوس ارئوس های مقاوم به متی سیلین درنمونه های بالینی بیماران بستری دربیمارستان های آموزشی شهر اهواز

سهیلا حسنیان[۱]، نور امیرمظفری[۲]، احمد فرج زاده شیخ[۳*]، ایرج مهرگان[۴]

۱- Ph.D. میکروبیولوژی.
۲-استاد گروه میکروب شناسی.
۳-استاد گروه میکروب شناسی.
۴-استاد گروه بیولوژی.

۱-گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران.
۲-گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
۳-گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.
۴-گروه بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران ، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول:
احمد فرج زاده شیخ؛ گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.
تلفن: ۰۰۹۸۹۱۶۱۱۳۳۴۹۱
Email: farajzadehah@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: *استافیلوکوکوس ارئوس* یکی از معدود باکتری‌های قادر به ایجاد عفونت در تمامی ارگان های بدن می باشد. این مطالعه با هدف بررسی مقایسه روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن با سایر روش های فنوتیپی و مولکولی در تعیین استافیلوکوکوس ارئوس‌های مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) در نمونه‌های بالینی بیماران بستری در بیمارستان های آموزشی شهراهواز و بررسی شیوع نسبی و تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی این باکتری طراحی و تنظیم گردید.

روش بررسی: تعداد ۶۹۳ ایزوله *استافیلوکوک* از نمونه های بالینی بیمارستان های اهواز جمع‌آوری گردید. با استفاده از روش های فنوتیپی و مولکولی استاندارد ۲۸۰ سویه به عنوان *استافیلوکوکوس ارئوس* جداسازی شدند. مقایسه روش‌های شناسائی سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین با استفاده از Oxacillin disk diffusion، Oxacillin screening agar، Cefoxitin disk diffusion و PCR انجام شد. همچنین تست حساسیت *استافیلوکوکوس اورئوس* با روش های دیسک دیفیوژن و ونکومایسین آگار اسکرینینگ نیز انجام شد.

یافته‌ها: از مجموع ۶۹۳ نمونه، ۲۸۰ نمونه به عنوان باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* تایید گردیدند. تعداد سویه های مقاوم به متی‌سیلین، (۴۳/۲٪)۱۲۱ سویه با روش دیسک دیفیوژن اگزاسیلین، (۴۳/۵٪)۱۲۲ سویه با روش غربالگری آگار اگزاسیلین و (۴۳/۹٪)۱۲۳ سویه با روش‌های دیسک دیفیوژن سفوکسیتین و PCR شناسائی شدند. در تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، بیشترین مقاومت نسبت به اریترومایسین (۹۸/۳٪)، سیپروفلوکساسین(۹۷/۵٪)، کلیندامایسین (۹۴/۳٪)، تتراسیکلین(۹۰/۲٪)، جنتامایسین (۸۳/۷٪)، ریفامپین(۴۱/۴٪) و کمترین مقاومت MRSA نسبت به آنتی-بیوتیک‌های تیکوپلانین(۰٪)، لینزولاید (۰٪)، ونکومایسین(۰٪) بدست آمد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان دهنده مقاومت نسبتا بالای آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از بیمارستان‌های مورد مطالعه می باشد. خوشبختانه مقاومت ۰٪ نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین، تیکوپلانین و لینزولاید وجود داشت. Cefoxitin disk diffusion بهترین روش در تعیین سویه‌های MRSA می باشد.

واژگان کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، MRSA، سفوکسیتین، مقاومت آنتی بیوتیکی.

دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۶/۲۵ دریافت مقالهٔ اصلاح‌شده: ۱۳۹۹/۴/۱۱ اعلام قبولی: ۱۳۹۹/۴/۲۲

مقدمه

باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*) مهم‌ترین گونه جنس *استافیلوکوک* در انسان است و طیف وسیعی از بیماری‌ها را سبب می‌گردد که از یک عفونت ساده پوستی تا عفونت‌های سیستمیک تهدید کننده حیات را شامل می‌شود. میزان شیوع بالایی از این باکتری در عفونت‌های زخم بعد از عمل جراحی گزارش شده است(۱). باکتریمی حاصل از این باکتری متعاقب عفونت در هر قسمت از بدن و در نتیجه کلنیزه شدن عفونت در هر کجای بدن ایجاد شده و می تواند منجر به سپتی‌سمی گردد. مثلاً از آبسه، اولسر، زخم های سوختگی و پنومونی و یا در نتیجه ورود مستقیم ارگانیسم به سیستم گردش خون توسط کاتترها، دستگاه‌هایی که در داخل بدن بکار گذاشته می‌شوند و یا سرنگ‌هایی که جهت تزریق دارو به بیماران استفاده می‌گردند(۳ و۲). بیمارانی که مبتلا به عفونت خون ناشی از *استاف اورئوس* می‌گردند، علایم تب و لرز را از خود نشان می‌دهند. ضایعات هموراژیک نیز در سطح پوست ممکن است ظاهر گردند و همچنین ممکن است این ضایعات گسترش پیدا کرده و تبدیل به اولسرهای نکروتیک گردند. قبل از معرفی پنی‌سیلین جهت درمان عفونت های *استافیلوکوکوس ارئوس* ، میزان مرگ و میر ناشی از سپتی‌سمی این باکتری در حدود ۸۰٪ بود. در اوایل دهه ۱۹۴۰ این آنتی‌بیوتیک جهت درمان عفونت ها بکار میرفت. اولین سویه مقاوم به پنی سیلین در سال ۱۹۴۲ ابتدا در بیمارستان و بعد در جامعه ایجاد شد. اما در سال ۱۹۶۱، یک سال بعد از معرفی متی‌سیلین، مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک نیز در اثر اکتساب ژن *mecA* ایجاد شد(۶ و۴). امروزه افزایش بی‌رویه در مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها موجب افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سطح جهان شده است(۵). عوامل مسبب بروز مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها شامل عناصر متحرک ژنتیکی نظیر پلاسمید و ترانسپوزون‌ها می‌باشند. از جمله این عناصر متحرک ژنتیکی می‌توان به *Staphylococcal* cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) اشاره نمود. ناحیه SCC*mec* فاکتورهای بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی را حمل می‌نماید. ژن *mecA* از جمله این فاکتورها می‌باشد که بروز مقاومت به متی‌سیلین را با تولید پروتئینی تحت عنوان PBP2a با افینیتی پایین به آنتی‌بیوتیک متی‌سیلین را القا می‌نماید(۱۶و۱۲و۱۱).

باتوجه به گسترش روزافزون سویه های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در باکتری *استاف‌اورئوس* و توانایی‌های منحصر به فرد این باکتری درانتقال فاکتورهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی به سایر باکتری ها و شناسایی گونه-های مقاوم به آنتی‌بیوتیک های جدید، کنترل و ریشه‌کنی این سویه‌ها و ممانعت از ورود آنها به جامعه حائز اهمیت می باشد. به دلیل بیان غیریکنواخت ژن *mecA*، تست‌های تشخیصی برای نشان دادن سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین (MRSA) نتایج متفاوتی را نشان می‌دهند(۲۵و۲۴و۷). بنابراین لازم است برای تشخیص دقیق و کنترل بیماری از روش‌های دقیق، سریع و اختصاصی‌تر استفاه گردد. اخیرا در مواردی استفاده از دیسک سفوکسیتین به عنوان یک روش جایگزین برای تشخیص ژن *mecA* مقاوم به متی‌سیلین در باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* گزارش شده است(۱۸و۱۷).

سفوکسیتین یک القا کننده قوی سیستم تنظیمی ژن *mec A* می‌باشد که در Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline نیز این روش بعنوان یک روش جایگزین برای تعیین سویه‌های MRSA معرفی شده است(۲۳). هدف از این مطالعه بررسی مقایسه روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن با سایر روش‌های فنوتیپی و مولکولی در تعیین سویه‌های MRSA در نمونه‌های بالینی بیماران بستری در بیمارستان‌های آموزشی شهر اهواز و همچنین بررسی شیوع نسبی *استافیلوکوکوس ارئوس* و تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی بود.

روش بررسی

ایزوله‌های *استافیلوکوکسی* در مدت ۶ ماه (از پاییز تا زمستان سال ۱۳۹۵) با مراجعه به آزمایشگاه‌های بیمارستان‌های آموزشی استان خوزستان (اهواز) جمع‌آوری و به آزمایشگاه میکروبشناسی دانشکده پزشکی اهواز منتقل شدند. ایزوله‌ها مربوط به بخش‌های ICU، مردان، زنان، جراحی عمومی، OPD، ارتوپدی، عفونی، درماتولوژی، نفرولوژی و داخلی بودند و از ترشحات لوله تراشه، خون، زخم، چشم، گوش، ادرار و مایع مغزی- نخاعی جمع‌آوری شدند. سپس سویه‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* با استفاده از روش‌های فنوتیپی استاندارد آزمایشگاهی و مولکولی شناسائی وجداسازی گردیدند.

تشخیص فنوتیپی باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس*: پس از جمع‌آوری ایزوله‌ها به‌عنوان باکتری *استافیلوکوکوسی*، ایزوله‌ها مجدداً در آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده پزشکی اهواز از نظر صحت هویت با استفاده از تست‌های استاندارد میکروبیولوژی کشت، رنگ-آمیزی گرم، تست کاتالاز، تخمیر قند مانیتول، کوآگولاز و DNase باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* شناسایی و تایید شدند. بدین ترتیب که نمونه‌ها پس از کشت بر روی محیط Blood Agar به مدت ۲۴ ساعت و در دمای۳۷°C گرمخانه گذاری شدند. سپس نمونه‌های کشت مثبت از نظر جنس *استافیلوکوکوسی* رنگ‌آمیزی و مطابق روش-های استاندارد میکروب شناسی ذکر شده شناسایی شدند. در رنگ‌آمیزی گرم باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* به شکل کوکسی گرم مثبت تشخیص داده شد(۲۲).

تست کاتالاز: با کشت تازه ۲۴-۱۸ ساعته باکتری بر روی محیط مولرهینتون آگار و با لوپ انجام شد. سپس یک قطره سرم فیزیولوژی استریل روی یک لام شیشه‌ای تمیز و خشک ریخته و به آن کلنی‌ها اضافه شدند. در مرحله بعد یک قطره پراکسید هیدروژن ۳٪ به سوسپانسیون مذکور افزوده شد. وجود حباب اکسیژن در مخلوط واکنش نشانه باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* کاتالاز مثبت می-باشد.

تخمیر قند مانیتول: نمونه‌ها پس از کشت مجدد روی محیط Mannitol salt agar (MSA) به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷°C انکوبه شده و در صورت تغییر رنگ محیط به زرد ایزوله‌های جداسازی شده به عنوان *استافیلوکوکوس ارئوس* مطرح شدند(۲۲).

آزمایش کوآگولاز: تولید کوآگولاز به دو روش اسلاید و لوله‌ای توسط پلاسمای سیتراته خرگوش انجام شد. ابتدا سویه ها به روش اسلاید آزمایش و در صورت منفی بودن از روش لوله‌ای استفاده شد. در این روش باکتری به ۰/۵ سی سی پلاسمای خرگوش اضافه سپس ۴ ساعت در ۳۷ °C انکوبه شد. سپس در صورت عدم رشد و لخته و منفی بودن ۲۴ ساعت دیگر نیز انکوبه شده و درصورت عدم وجود لخته منفی تلقی گردید. باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* کواگولاز مثبت می‌باشد(۲۲).

تست DNase : باکتری را روی محیط DNase کشت داده، بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷°C و رشد باکتری، اسیدکلریدریک ۱ نرمال را بر سطح محیط ریخته، بعد از چند دقیقه با تشکیل هاله شفاف تست مثبت و درصورت عدم وجود هاله اطراف کلنی تست منفی درنظر گرفته شد. باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس*، DNase مثبت می‌باشد(۲۲).

تعیین الگوی آنتی‌بیوگرام با روش دیسک دیفیوژن: آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی توسط روش دیسک دیفیوژن کربی- بائر (Kirby Bauer Disk diffusion method) در محیط Muller Hinton Agar (MHA، شرکت Merck) با دیسک های کاغذی آغشته به آنتی‌بیوتیک و با رعایت استانداردهای (Clinical and Laboratory Standards Institute) CLSI انجام شد(۲۳). کلیه دیسک‌ها از شرکت MAST انگلستان تهیه گردید.

روش‌های فنوتیپی تشخیص *استافیلوکوک‌ارئوس* مقاوم به متی‌سیلین:

Oxacillin disk diffusion: پس از حصول اطمینان از شناسایی و تأیید ابتدایی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس*، نسبت به تعیین سویه ها از نظر مقاومت به آنتی بیوتیک اگزاسیلین (۱ میکروگرم) با روش دیسک دیفیوژن بر اساس استانداردهای Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) اقدام شد(۲۳). بدین منظور سوسپانسیونی از کشت ۲۴-۱۸ ساعته باکتری با کدورتی معادل نیم مک فارلند تهیه گردید، سپس روی محیط مولر هینتون آگار **(Merck)** کشت داده شد. دیسک های اگزاسیلین ۱ میکروگرمی (Mast) را روی محیط قرار داده و ۲۴ ساعت در۳۷°C انکوبه گردید. بر اساس معیار CLSI در مورد اگزاسیلین، سویه‌هایی که هاله عدم رشد آنها کمتر از ۱۰ میلیمتر بود، به عنوان استافیلوکوک ارئوس‌های مقاوم به اگزاسیلین در نظر گرفته شدند.

شناسایی سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین با استفاده از دیسک سفوکسیتین (Cefoxitin disk diffusion test) : همچنین برای شناسایی سویه‌های مقاوم به متی-سیلین مبتنی بر حساسیت به سفوکسیتین، همانندروش دیسک دیفیوژن از دیسک سفوکسیتین (۳۰ میکروگرمی) استفاده شد. از کشت تازه باکتری معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه سپس روی محیط مولرهینتون آگار MHA بصورت چمنی کشت داده و بمدت ۱۸ساعت انکوباسیون در ۳۷°C انجام شد. هاله عدم رشد کمتراز ۲۱ میلیمتر (≤۲۱mm) سویه مقاوم و بیشتر از ۲۲ میلیمتر (≥۲۲mm) سویه حساس درنظرگرفته شد. تمام جدایه ها در معرض دیسک سفوکسیتین قرار گرفتند(۲۳). ازسویه های استاندارد *استافیلوکوکوس ارئوس* مقاوم به متی‌سیلین ATCC 33591 بعنوان کنترل مثبت و ATCC 25923 بعنوان کنترل منفی در تایید و کنترل آنتی‌بیوگرام استفاده گردید.

Oxacillin agar screening : جهت جداسازی سویه‌های MRSA براساس استانداردهای CLSI انجام شد (۲۳ و۲۲). ابتدا سوسپانسیونی از کشت تازه باکتری معادل ۰/۵ مک فارلند در محیط TSB تهیه سپس روی محیط مولرهینتون آگار (MHA) حاوی ۴٪ نمک و ۶ µg/ml آنتی‌بیوتیک اگزاسیلین بصورت نقطه‌ای کشت داده و بمدت ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۵°C انجام شد. در صورت رشد باکتری به عنوان سویه مقاوم به متی-سیلین در نظر گرفته شد(۳۸).

Vancomycin agar screening: جهت جداسازی سویه‌های مقاوم به ونکومایسین (VRSA) براساس استانداردهای CLSI انجام شد. از محیط Brain Heart Infusion agar (BHI)، حاوی ۴٪ نمک و ۶ µg/ml پودر آنتی‌بیوتیک ونکومایسین (Sigma) استفاده شد. مقدار ۱۰ µl از سوسپانسیون کشت تازه باکتری معادل ۰/۵ مک فارلند بصورت نقطه‌ای کشت داده شد. در صورت رشد باکتری به عنوان سویه مقاوم و در صورت عدم رشد به عنوان سویه حساس به ونکومایسین در نظر گرفته شد(۳۸)

برای نگهداری نمونه‌ها از محیط مایع Tryptic soy broth (TSB) حاوی ۱۵٪ گلیسرول بعنوان نگهدارنده استفاده شد و سپس نمونه‌ها در فریزر با دمای ۲۰°C- نگهداری شدند.

روش های مولکولی :

استخراج DNA : DNA باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* توسط روش جوشاندن استخراج شد. به این ترتیب که باکتری پس از کشت روی محیط مولر هینتون آگار MHA (شرکت MERCK) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C گرم خانه گذاری شده سپس ۳ عدد تا ۵ عدد کلنی *استافیلوکوکوس ارئوس* در ویال اپندورف ۱/۵ میلی لیتری حاوی ۵۰۰ میکرولیتر 1XTE buffer حل گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس جوشانده شد. به منظور وارد آمدن شوک به باکتری و لیز دیواره آن،

به مدت ۲۰ دقیقه، داخل فریزر منفی ۲۰ نگهداری شد، پس از آن به دستگاه سانتریوفوژ منتقل وبه مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰rpm سانتریفوژ گردید. سپس مایع رویی به عنوان DNA جمع آوری گردید(۲۲). برای سنجش غلظت DNA از دستگاه BioPhotometer (شرکت Eppendorf کشور آلمان) استفاده شد.

تایید مجدد *استافیلوکوکوس ارئوس* توسط روش های مولکولی: ایزوله های *استافیلوکوکوس ارئوس* که توسط روش های کشت و فنوتیپی تعیین و تایید شدند، با تکثیر ژن نوکلئاز (*nuc* gene) با روش PCR مورد تایید مجدد قرار گرفتند. برای انجام واکنش PCR از جفت پرایمرهای اختصاصی بر مبنای تکثیر ژن *nuc* طبق جدول۱ استفاده شد.

واکنش PCR برای ژن *nuc* : واکنش PCR در حجم نهایی 20µl انجام شد. ترکیب ریجنت ها در مسترمیکس و سیکل حرارتی برای ژن *nuc*، همانند واکنش PCR برای ژن *mecA* و طبق جداول ۲ و ۳ می باشد، با این تفاوت که دمای annealing برای ژن *nuc*، ۵۰°C بکار رفت.

واکنش PCR برای ژن *mecA* : برای انجام آزمایش PCR و تشخیص ژن *mecA* در نمونه‌های MRSA، ابتدا توالی سنتز پرایمر سفارش داده شد (سیناژن، تهران، ایران) و پس از BLAST ژن‌های مورد نظر، واکنش PCR در حجم نهایی 20µl با استفاده از پرایمرها طبق جدول ۱ انجام شد.

مقادیر مناسب ترکیبات مورد استفاده و سیکل حرارتی در جداول ۲ و ۳ آمده است. واکنشPCR در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf, Germany) انجام شد.

الکتروفورز محصولات : محصولات PCR در ژل آگارز ۱/۵٪ و با 1X Tris-boric acid EDTA buffer (TBE) در ۱۰۰V به مدت ۱۰۰ دقیقه الکتروفورز گردید. رنگ‌آمیزی ژل با safe stain (سیناژن، تهران، ایران) برای مشاهده قطعات تکثیر شده DNA به طول ۳۱۰ bp برای ژن *mecA* تحت نور UV و با لدر (100 bp ladders, euro bio, UK) انجام شد. از سویه های استاندارد ATCC 33591 *استافیلوکوکوس ارئوس* و ATCC 25923 *استافیلوکوکوس ارئوس* به عنوان کنترل مثبت به ترتیب برای ژن های *mecA* و *nuc*، و از آب مقطر به عنوان کنترل منفی در واکنش PCR استفاده شد(۳۶و۳۵)

نتیجه الکتروفورز محصول PCR تحت نور UV توسط دستگاه Gel doc (Germany) در طول موج ۵۶۰ nm به رنگ قرمز بنفش دیده شد. پس از تایید ژن *mecA* جدایه‌ها وارد مطالعه شدند.

تعیین حساسیت و ویژگی روش‌های تشخیصی MRSA: حساسیت و اختصاصیت روش‌های Oxacillin disk diffusion، Oxacillin screening agar، Cefoxitin disk diffusion و PCR طبق فرمول زیر بدست آمد.

$$\text{sensitivity} = \frac{\text{number of true positives}}{\text{number of true positives} + \text{number of false negatives}}$$

$$\text{specificity} = \frac{\text{number of true negatives}}{\text{number of true negatives} + \text{number of false positives}}$$

جدول ۱: توالی پرایمرها مورد استفاده

Gene name	Primer sequence	Size (bp)	Reference
Nuc	F : 5'-GCGATTGATGGTGATACGGTT-3' R : 5'-AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC-3'	۲۷۹ bp	۲۱
mecA	F : 5'-GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA-3' R : 5'-CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA-3'	۳۱۰ bp	۳۷

جدول ۲: مقادیر مناسب ترکیبات مورد استفاده برای واکنش PCR

Material	Stock concentration	Total concentration	Vol.
PCR Buffer	۱۰ X	۱ X	۲ µl
$MgCl_2$	۵۰ mM	۱/۵ mM	۰/۶ µl
dNTP Mix	۱۰ mM	۰/۴ mM	۰/۸µl
PrimerI-F	۱۰ µM	۰/۴ µM	۰/۸µl
Primer I-R			۰/۸µl
Taq polymerase	۵ u/µl	-	۰/۲µl
DNA Template	-	-	۲µl
D.W	-	-	۱۲µl
Total			۲۰µl

جدول ۳: شرایط set up چرخه دمایی واکنش PCR جهت شناسایی ژن های *mecA*

	Temperature	Time(s)
initial denaturation	۹٤°C	۳۰۰
Cycle: ۳۰ Denaturation	۹٤°C	۶۰
Cycle: ۳۰ Annealing	۵۲°C	۶۰
Cycle: ۳۰ Extension	۷۲°C	۱۲۰
Final extension	۷۲°C	۳۰۰

یافته‌ها

در این مطالعه از مجموع ۶۹۳ ایزوله *استافیلوکوک* منتقل شده از بیمارستان ها، براساس روش های فنوتیپی استاندارد (۴۰/۴٪) ۲۸۰ ایزوله به عنوان *استافیلوکوکوس ارئوس* مشخص شدند.

نتایج ژنوتیپی نشان داد که از مجموع ۶۹۳ ایزوله *استافیلوکوک* ، ۲۸۰ ایزوله دارای ژن *nuc* بودند و به عنوان باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* شناسایی و تایید شد.

آزمایشات فنوتیپی نشان داد که از تعداد ۲۸۰ ایزوله مذکور، ۱۲۳سویه مقاوم به متی سیلین (MRSA) بودند.

بالاترین میزان شیوع MRSA در بیمارستان طالقانی (۴۱/۵٪) ۵۱ مورد مشاهده شد. همچنین اکثر ایزوله‌های MRSA متعلق به بخش ICU بودند. فراوانی ایزوله‌های

MRSA مطابق بخش بیمارستان و نوع نمونه‌های بالینی به ترتیب در جداول ۵ و ۶ نشان داده شده است. بیشترین ایزوله‌ها مربوط به نمونه زخم بودند. الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های MRSA نشان داد که بیشترین میزان مقاومت در سویه های MRSA متعلق به آنتی-بیوتیک اریترومایسین(۹۸/۳٪) بود. بعلاوه کمترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های تیکوپلانین(۰٪)، لینزولاید (۰٪)، ونکومایسین(۰٪) وجودداشت. الگوی حساسیت آنتی-بیوتیکی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و MRSA به ترتیب در جداول ۴ و ۷ آمده است.

در بررسی روش‌های شناسائی سویه‌های MRSA نتایج این مطالعه نشان داد که از میان ۲۸۰ ایزوله *استافیلوکوکوس ارئوس*، (۴۳/۲٪)۱۲۱ سویه MRSA توسط اگزاسیلین دیسک دیفیوژن(1 µg) ، (۴۳/۵٪)۱۲۲ سویه با غربالگری در آگار اگزاسیلین (6 µg) و (۴۳/۹٪) ۱۲۳ سویه با سفوکسیتین دیسک دیفیوژن (30 µg) و PCR شناسایی شدند.

همه ۲۸۰ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* که با روش‌های فنوتیپی مشخص شدند، با روش‌های مولکولی جهت نشان دادن ژن های *nuc* و *mecA* با روش PCR مورد آزمایش قرار گرفتند. در ۱۰۰٪ از همه سویه‌های MRSA (۴۳/۹٪) ۱۲۳مورد که با روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن تعیین شدند، با روش PCR نیز همگی دارای ژن *mecA* بودند (شکل۱و۲). نتایج مربوط به حساسیت و اختصاصیت سه تست فنوتیپی در مقایسه با آزمون ژنوتیپی در جدول ۸ آمده است. نتایج حساسیت برای روش‌های اگزاسیلین دیسک دیفیوژن و غربالگری در آگار اگزاسیلین به ترتیب ۹۸٪ و ۹۹٪ و برای سفوکسیتین دیسک دیفیوژن و PCR ۱۰۰٪ و نتایج اختصاصیت برای هر چهار روش ۱۰۰٪ بود.

جدول ۴: الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله های *استافیلوکوکوس اورئوس*

آنتی بیوتیک	مقاومت تعداد (٪)
Erythromycin	۲۳۶ (۸۴/۳)
Ciprofloxacin	۲۳۲ (۸۲/۹)
Clindamycin	۲۲۹ (۸۱/۸)
Tetracycline	۲۲۳ (۷۹/۶)
Gentamicin	۱۹۹ (۷۱/۱)
Rifampicin	۸۴ (۳۰)
Ticoplanin	۰(۰٪)
Linzolide	۰(۰٪)
Vancomycin	۰(۰٪)

جدول ۵: توزیع فراوانی سویه های MRSA در بخش های مختلف بیمارستان

بخش/	ایزوله های MRSA تعداد (٪)
ICU	۴۱ (۳۳/۳)
مردان	۱۰ (۸/۱)

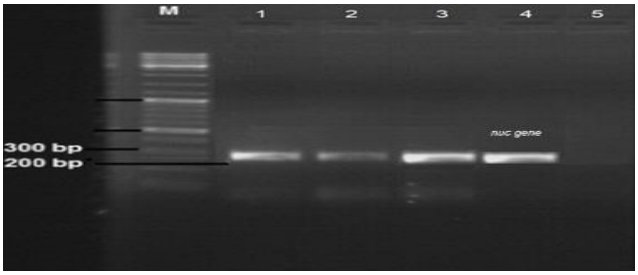
زنان	۴ (۳/۳)
جراحی عمومی	۷ (۵/۷)
OPD	۱۱ (۸/۹)
ارتوپدی	۷ (۵/۷)
عفونی	۲۷ (۲۲)
درماتولوژی	۶ (۴/۹)
نفرولوژی	۷ (۵/۷)
داخلی	۳ (۲/۴)
جمع کل	۱۲۳ (۱۰۰)

جدول ۶: توزیع فراوانی سویه های MRSA براساس نوع نمونه بالینی

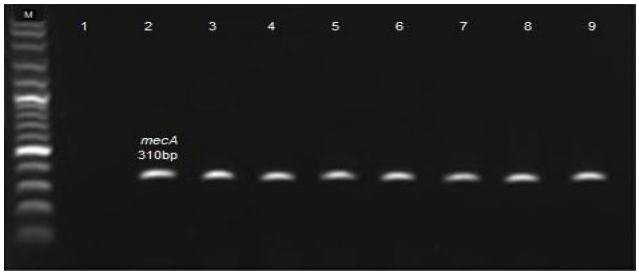
نمونه	ایزوله های MRSA تعداد (٪)
زخم	۷۴ (۶۰/۲)
خون	۲۵ (۲۰/۳)
لوله تراشه	۱۴ (۱۱/۴)
ادرار	۸ (۶/۵)
سایر نمونه ها	۲ (۱/۶)
جمع کل	۱۲۳ (۱۰۰)

جدول ۷: الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله های MRSA

آنتی بیوتیک	مقاومت تعداد (٪)
Erythromycin	۱۲۱ (۹۸/۳)
Ciprofloxacin	۱۲۰ (۹۷/۵)
Clindamycin	۱۱۶ (۹۴/۳)
Tetracycline	۱۱۱ (۹۰/۲)
Gentamicin	۱۰۳ (۸۳/۷)
Rifampicin	۵۱ (۴۱/۴)
Ticoplanin	۰(٪۰)
Linzolide	۰(٪۰)
Vancomycin	۰(٪۰)



شکل ۱: نتایج الکتروفورز حاصل از آمپلیفیکاسیون ژن *nuc*
(Lane M: molecular size marker (100bp, 279bp)
(lanes 1 to 3: DNA ladder, *nuc* gene، lane 4: کنترل مثبت، lane 5: کنترل منفی.



شکل ۲: نتایج الکتروفورز حاصل از آمپلیفیکاسیون ژن *mecA*
(Lane M: molecular size marker (100bp, 310 bp)
(lane 1: DNA ladder، lane 2: کنترل منفی، lanes 3 to 9: کنترل مثبت، *mecA* gene

جدول ۸: مقایسه سه روش فنوتیپی با ژنوتیپی برای شناسایی ایزوله های MRSA

روش	MRSA (تعداد)	حساسیت (%)	اختصاصیت (%)
اگزاسیلین دیسک دیفیوژن(1 µg)	۱۲۱	٪۹۸	۱۰۰
غربالگری در آگار اگزاسیلین(6 µg)	۱۲۲	٪۹۹	۱۰۰
سفوکسی‌تین‌دیسک‌دیفیوژن (30 µg)	۱۲۳	٪۱۰۰	۱۰۰
PCR شناسایی ژن *mecA*	۱۲۳	٪۱۰۰	۱۰۰

بحث

جستجوی ژن *mecA* بعنوان استاندارد طلایی تایید MRSA در نظر گرفته می‌شود(۱۰). مطالعات اخیر نشان داده که روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن نسبت به سایر روش‌های فنوتیپی رایج نظیر اگزاسیلین دیسک دیفیوژن و غربالگری در آگار اگزاسیلین توصیه می‌شود و حالا بعنوان یک روش قابل قبول برای تعیین MRSA توسط اکثر گروه های مرجع شاملCLSI پذیرفته شده است(۱۵). باتوجه به روند روبه افزایش عفونت‌های ناشی از MRSA، تشخیص دقیق وسریع بیماری جهت انتخاب درمان آنتی‌بیوتیکی مناسب و بعلاوه کنترل همه‌گیری بیماری، ضروری است(۱۴و۱۳). تعیین سریع سویه‌های مقاوم به متی سیلین از اهمیت زیادی در تشخیص عفونت-های حاصل از *استافیلوکوکوس اورئوس* برخوردار است. در این مطالعه ارزیابی روش‌های مختلف در تعیین ژن *mecA* بررسی شد. از میان تمام ایزوله های *استافیلوکوک* جدا شده، (۴۰/۴٪) ۲۸۰ آنها *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند.

برخی مطالعات اپیدمیولوژی میزان شیوع عفونت های MRSA را بیش از ۵۰٪ نشان داده‌اند(۳۹و۳۴و۸) ، در مطالعه حاضر شیوع آن (۴۳/۹٪) ۱۲۳ بود. میزان شیوع

بیماری در مصر ۷۱٪ و در آفریقای جنوبی ۲۶/۹٪ گزارش گردیده است (۲۹و۲۸). بنابراین نتایج این تحقیق کمتر از مصر و بیشتر از آفریقای جنوبی است. بالاترین میزان شیوع MRSA در بیمارستان طالقانی (۴۱/۵٪) ۵۱ مشاهده شد. اکثر ایزوله‌های MRSA متعلق به بخش ICU (۳۳/۳٪) بودند. شیوع عفونت‌های MRSA در کشورهای اسکاندیناوی کمتر از ۲٪ و در کشورهای مدیترانه‌ای بیش از ۴۰٪ می‌باشد(۹). بستری شدن و مصرف بی‌رویه آنتی-بیوتیک‌ها می‌تواند منجر به کلنیزه شدن و عفونت با سویه-های MRSA گردد. خوشبختانه در این بررسی هیچگونه مقاومتی در سویه‌های MRSA نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تیکوپلانین(۰٪)، لینزولاید(۰٪)، ونکومایسین(۰٪) وجود نداشت، در حالیکه در مطالعه Akanbi میزان ۱۵٪ به ونکومایسین، در مطالعه Tiwari از تعداد ۷۸۳ *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۲ سویه به ونکومایسین و تیکوپلانین و در مطالعه García تعداد ۱۲ بیمار به لینزولید مقاوم بودند (۳۳ و۳۲ و۳۱).

در مطالعه حاضر تفاوت بین روش های مختلف (اگزاسیلین دیسک دیفیوژن، غربالگری در آگار اگزاسیلین، سفوکسیتین دیسک دیفیوژن) و روش ژنوتیپی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز PCR برای تشخیص ژن *mecA* بررسی شد. برای نشان دادن سویه‌های MRSA با روش-های ۴ گانه انجام شده، مشخص شد که اگزاسیلین دیسک دیفیوژن (۱µg) و روش دیسک سفوکسیتین (۳۰µg) ، به ترتیب ۹۸٪ و ۱۰۰٪ توانائی تشخیص سویه های MRSA را دارا بودند. بعلاوه نتایج روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن با نتایج حاصل از PCR برای تعیین ژن *mecA* مطابقت داشت (جدول ۸).

برخی مطالعات اخیر نیز روش دیسک دیفیوژن سفوکسیتین را دقیق‌تر دانسته و استفاده این روش را بسیار بیشتر از روش‌های فنوتیپی رایج مانند اگزاسیلین دیسک دیفیوژن و غربالگری در آگار اگزاسیلین در تشخیص سویه‌های MRSA توصیه کرده اند(۳۱ و۳۰و۱۹).

در مطالعه Anand و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی ۵۰ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۳۲ نمونه به روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن، مقاوم بودند و همه آنها در بررسی با روش PCR نیز دارای ژن *mecA*، ولی با روش غربالگری در آگار اگزاسیلین ۳۱ نمونه و با روش اگزاسیلین دیسک دیفیوژن ۲۸ نمونه به اگزاسیلین مقاوم بودند(۱۹).

pramodhini و همکاران نیز درسال ۲۰۱۱ از میان ۵۵ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۲۰ نمونه MRSA و با میزان حساسیت و اختصاصیت ۱۰۰٪ را با روش‌های PCR و دیسک سفوکسیتین جداسازی کردند، درحالیکه روش اگزاسیلین دیسک دیفیوژن دارای اختصاصیت ۱۰۰٪ و حساسیت ۹۰٪ بود(۲۰). بنابراین نتایج دو مطالعه فوق با نتایج حاصل از مطالعه حاضر مطابقت دارد. حساسیت و اختصاصیت روش سفوکسیتین در این مطالعه نیز نزدیک به حسایت و اختصاصیت ذکرشده دردو مطالعه مذکور (حساسیت ۱۰۰ درصد، اختصاصیت ۱۰۰ درصد) می باشد.

در مطالعه غزنوی‌راد و همکاران در سال ۱۳۹۳ یافته‌ها نشان داد که روش اگزاسیلین دیسک دیفیوژن هرچند روشی فنوتیپی و ساده می باشد اما نسبت به روش سفوکسیتین دیسک از حساسیت کمتری برخوردار است و جهت شناسایی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین روشی قابل اطمینان نمی‌باشد. همچنین وجود سویه‌های مقاوم به سفوکسیتین بدون ژن *mecA* احتمالا بیانگر بروز نوع دیگری مقاومت و یا موتاسیون در سویه‌های باکتری می‌باشد(۲۶).

در مطالعه Iraz و همکاران در سال ۲۰۱۲ روش-های مختلف فنوتیپی انتشار دیسک، غربالگری اگزاسیلین آگار، لاتکس آگلوتیناسیون و سیستم خودکار BD و PCR جهت تشخیص MRSA مقایسه و بررسی شدند. نتایج نشان داد که در تشخیص MRSA، روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن نسبت به روش اگزاسیلین دیسک دیفیوژن مفیدتر بوده، اما روش سیستم خودکار

BD موفق تر از سایر روش‌های فنوتیپی بود(۲۷). از نظر بالینی افتراق بین ایزوله‌های مقاوم دارای ژن *mecA* مثبت از ایزوله‌های کمیاب دارای مقاومت مرزی بعلت تاثیر آن در درمان بیماری، مهم است. سویه‌های دارای ژن مقاومت *mecA* کلاسیک، در بیان ژن مقاومت، هتروژنوس یا هموژنوس هستند. این روش برای ایزوله‌های مقاوم heteroresistant است که ممکن است بصورت حساس تظاهر کنند. معمولا وجود مقاومت در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در روش oxacillin screen agar به معنی وجود ایزوله‌های حاوی ژن *mecA* مثبت است. اگرچه گاهی اوقات سویه‌های heteroresistant دارای ژن *mecA* مثبت با بیان کم و پایین ژن های مقاومت، تشخیص داده نمی‌شوند. وقتی مطالعه مربوط به سویه‌های مقاوم هتروژنوس باشد، آزمایش کیفیت پایینی داشته و معمولا با روش غربالگری در آگار اگزاسیلین سویه‌های مقاوم مرزی تعیین نمی‌شوند. بعلاوه روشهای Agar dilution و اگزاسیلین دیسک دیفیوژن ممکن است تحت تاثیر مدت زمان انکوباسیون، ترکیبات مختلف محیط MHA و دما قرار بگیرند(۳۰). این امر می‌تواند باعث ایجاد تفاوت بین نتایج حاصل از این تست‌ها با روش استاندارد طلایی شود. در چند سال اخیر مؤسسه استاندارد CLSI تلاش‌های گسترده‌ای را برای افزایش دقت و بهبود روش‌های مورد استفاده جهت شناسایی و تشخیص سویه‌های MRSA انجام داده است. سرعت و دقت بالای این روش‌ها می تواند منجر به تشخیص و درمان بموقع بیماری شود. تشخیص ژن *mecA* با روش PCR ، به عنوان استاندارد طلایی برای تعیین MRSA محسوب می شود(۲۳). از آنجایی که این روش بطور معمول در آزمایشگاه انجام نشده و از طرفی پرهزینه می باشد لذا جایگزینی روشی ساده، کم هزینه و سریع در تشخیص این سویه‌ها حائز اهمیت می‌باشد. نتایج این مطالعه جهت تعیین ویژگی و حساسیت ۴ روش انجام شده، نشان داد که استفاده از روش دیسک دیفیوژن سفوکسیتین (طبق استاندارد CLSI) به عنوان معیاری در تعیین سویه‌های مقاوم (با قطرهاله ۲۱mm ≤ برای سویه‌های مقاوم و ۲۲mm≥ میلی‌متر برای سویه‌های حساس) است، همچنین۱۰۰٪ حساسیت و اختصاصیت در همه ۱۲۳ سویه‌های مورد مطالعه با روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن وجود داشت که با نتایج Hafiza Sultana مطابقت دارد(۳۹). درحالیکه نتایج حاصل از غربالگری در آگار اگزاسیلین خیلی دقیق نبود. این مطالعه شواهدی را دال بر استفاده از روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن به عنوان یک روش دقیق جایگزین در آزمایش تعیین حساسیت روتین را فراهم می‌کند.

نتیجه گیری

نتایج نشان داد که روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن دارای ۱۰۰٪ حساسیت و اختصاصیت در مقایسه با PCR برای تعیین سویه‌های مقاوم حاوی ژن *mecA* می باشد. از اینرو، می‌توان از آن به عنوان یک روش جایگزین مناسب برای PCR استفاده کرد. بنابراین روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن، برای تعیین سویه‌های MRSA در آزمایشگاه‌های بالینی بسیار مناسب بوده و می‌توان از آن به عنوان یک روش ساده و کم هزینه درتعیین این سویه‌ها استفاده کرد. همچنین بهترین روش مورد استفاده به طورمعمول و برطبق معیار CLSI می باشد.

قدردانی

بدین وسیله از مسئولین محترم مربوطه دردانشگاه آزاد اسلامی تهران به دلیل همکاری های بی‌دریغشان سپاسگزاری و قدردانی می شود. با تشکر از پرسنل آزمایشگاه میکروب شناسی بیمارستان های امام خمینی (ره)، رازی، طالقانی و گلستان شهر اهواز که در خصوص جمع آوری نمونه ها با ما همکاری نمودند. همچنین

ازمسئولین و کارکنان محترم بخش میکروبشناسی دانشکده پزشکی اهواز، آزمایشگاه سلولی ومولکولی، و همچنین از جناب آقای دکتر بقایی، آقای دکترشاهین و آقای دکتر مقدادی تشکر می‌شود.

.

منابع

1-Gordon RJ, Lowy FD. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. clinic.infect. dis. 2008; 46: 350-9.

2-Shittu AO, Okon K, Adesida S, Oyedara O, Witte W, Strommenger B, Layer F, Nübel U. Antibiotic resistance and molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* in Nigeria. BMC MICROBIOL. 2011; 11(1): 92.

3-Mathews AA, Thomas M, Appalaraju B, Jayalakshmi J. Evaluation and comparison of tests to detect methicillin resistant *S. aureus*. Idian J Pathol Microbiol. 2010; 53(1): 79-82.

4-CHAMBERS HF. Community-associated MRSA: Resistance and virulence converge. N. Engl. J. Med. 2005; 352(14):1485-7.

5-Carvalho MJ, Pimenta FC, Hayashida M, Gir E, Silva AM, Barbosa CP, Canini SR, Santiago S. Prevalence of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *S. aureus* in the saliva of health professionals. Med. Clin. 2009 Apr; 64(4): 295-302.

6-Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. INFECT GENET EVOL. 2008; 8: 747-63.

7-Kaczmarek A, Budzyńska A, Mikołajczyk D, Gospodarek E. Comparison of disk-diffusion method and PCR for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* strains. Med Dosw Mikrobiol. 2006; 58(2): 87-93.

8-Song JH, Hsueh PR, Chung DR, Ko KS, Kang CI, Peck KR, Yeom JS, Kim SW, Chang HH, Kim YS, Jung SI. Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between the community and the hospitals in Asian countries: an ANSORP study. Antimicrob Chemother J. 2011; 66(5): 1061-9.

9-Stefani S, Varaldo PE. Epidemiology of methicillin-resistant *staphylococc*i in Europe. Clin Microbiol Infect. 2003; 9(12): 1179-86.

10-John MA, Burden J, Stuart JI, Reyes RC, Lannigan R, Milburn S, Diagre D, Wilson B, Hussain Z. Comparison of three phenotypic techniques for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus spp*. reveals a species-dependent performance. Antimicrob Chemother J. 2009; 63(3): 493-6.

11-Turlej AG, Hryniewicz WA, Empel J. *Staphylococcal* cassette chromosome *mec* (Scc*mec*) classification and typing methods: an overview. Pol J Microbiol. 2011;60(2):95-103.

12-Ender M, Burger S, Sokoli A, Zbinden R, Berger-Bächi B, Heusser R, Senn MM, McCallum N. Variability of SCC*mec* in the Zurich area. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009; 28(6): 647.

13-Tsubakishita S, Kuwahara-Arai K, Sasaki T, Hiramatsu K. Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in *staphylococci*. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54(10): 4352-9.

14-Liakopoulos A, Foka A, Vourli S, Zerva L, Tsiapara F, Protonotariou E, Dailiana Z, Economou M, Papoutsidou E, Koutsia-Carouzou C, Anastassiou ED. Aminoglycoside-resistant *staphylococci* in Greece: prevalence and resistance mechanisms. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011; 30(5): 701-5.

15-Skov R, Smyth R, Larsen AR, Bolmstrom A, Karlsson A, Mills K, Frimodt-Moller N, Kahlmeter G. Phenotypic detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* by disk diffusion testing and Etest on Mueller-Hinton agar. Clin Microbiol J. 2006; 44(12): 4395-9.

16-Robinson DA, Enright MC. Multilocus sequence typing and the evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect. 2004; 10(2): 92-7.

17- Matos PD, Schuenck RP, Cavalcante FS, Caboclo RM, dos Santos KR. Accuracy of phenotypic methicillin susceptibility methods in the detection of *Staphylococcus aureus* isolates carrying different SCC*mec* types. Mem Inst Oswaldo Cruz J. 2010; 105(7): 931-934.

18-Skov R, Smyth R, Clausen M, Larsen AR, Frimodt-Møller N, Olsson-Liljequist B, Kahlmeter G. Evaluation of a cefoxitin 30 µg disc on Iso-Sensitest agar for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Chemother J. 2003; 52(2): 204-7.

19-Anand KB, Agrawal P, Kumar S, Kapila K. Comparison of cefoxitin disc diffusion test, oxacillin screen agar, and PCR for *mecA* gene for detection of MRSA. Indian J Med Microbiol. 2009; 27(1): 27.

20-Pramodhini S, Thenmozhivalli PR, Selvi R, et al. Comparison of Various Phenotypic Methods and *mecA* Based PCR for the Detection of MRSA. J Clin Diagn Res 2011; 5: 1359-62.
21-Zhang K, Sparling J, Chow BL, Elsayed S, Hussain Z, Church DL, Gregson DB, Louie T, Conly JM. New quadriplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative *staphylococci*. J Clin Microbiol. 2004; 42(11): 4947-55.
22-Brown DF, Edwards DI, Hawkey PM, Morrison D, Ridgway GL, Towner KJ, Wren MW. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). J. Antimicrob. Chemother. 2005; 56(6): 1000-18.
23-Wayne P (2014). Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.
24-Ercis S, Sancak B, Hascelik G. A comparison of PCR detection of *mecA* with oxacillin disk susceptibility testing in different media and sceptor automated system for both *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *staphylococci* isolates. Indian J Med Microbiol. 2008; 26(1): 21.
25-Felten A, Grandry B, Lagrange PH, Casin I. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. J Clin Microbiol. 2002; 40(8): 2766-71.
26-Ghaznavi-Rad E. Comparison of molecular methods in epidemiological typing of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. ISMJ. 2014; 17(3): 326-35.
27-Iraz M, Tekerekoglu MS, Otlu B, Ay S. Comparison of an automated system with four phenotypic methods for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Afr J Microb Res. 2012; 6(4): 764-9.
28-El Kholy A, Baseem H, Hall GS, Procop GW, Longworth DL. Antimicrobial resistance in Cairo, Egypt 1999–2000: a survey of five hospitals. J. Antimicrob. Chemother. 2003; 51(3): 625-30.
29-Shittu AO, Lin J. Antimicrobial susceptibility patterns and characterization of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in KwaZulu-Natal province, South Africa. BMC Infect. Dis. 2006; 6(1): 125.
30-Jain A, Agarwal A, Verma,RK. Cefoxitin disk diffusion test for detection of meticillin-resistant *staphylococci*. J. Med. Microbiol. 2008; 57: 957-61.
31-Akanbi BO, Mbe JU. Occurrence of methicillin and vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* in University of Abuja Teaching Hospital, Abuja, Nigeria. Afr J Clin Exper Microbiol. 2013;14(1):10-13.
32-Tiwari HK, Sen MR. Emergence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India. BMC Infect. Dis. 2006; 6(1): 156
33-García MS, De la Torre MÁ, Morales G, Peláez B, Tolón MJ, Domingo S, Candel FJ, Andrade R, Arribi A, García N, Sagasti FM. Clinical outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* in an intensive care unit. Jama. 2010; 303(22): 2260-4.
34-Ko KS, Lee JY, Suh JY, Oh WS, Peck KR, Lee NY, Song JH. Distribution of major genotypes among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Asian countries. J Clin Microbiol. 2005; 43(1): 421-6.
35-Kalorey DR, Shanmugam Y, Kurkure NV, Chousalkar KK, Barbuddhe SB. PCR-based detection of genes encoding virulence determinants in *Staphylococcus aureus* from bovine subclinical mastitis cases. J. Vet. Sci. 2007; 8(2): 151-4.
36-Japoni A, Jamalidoust M, Farshad S, Ziyaeyan M, Alborzi A, Japoni S, Rafaatpour N. Characterization of SCC*mec* types and antibacterial susceptibility patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Southern Iran. JPN J INFECT DIS. 2011; 64(1): 28-33.
37-McClure JA, Conly JM, Lau V, Elsayed S, Louie T, Hutchins W, Zhang K. Novel multiplex PCR assay for detection of the *staphylococcal* virulence marker Panton-Valentine leukocidin genes and simultaneous discrimination of methicillin-susceptible from-resistant *staphylococci*. J Clin Microbiol. 2006; 44(3): 1141-4.
38-Wayne P (2011). Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.
39-Sultana H, Sarker JN, Yusuf A, Bhuiyan TH, Rahman M, Tarafder S. Validity of Cefoxitin Disc Diffusion Test for the Detection of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Am J Infect Dis Microbiol. 2018; 6: 26-29.

Comparison of Cefoxitin Disk Disffusion Method with Other Phenotypic and Molecular Methods in Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Clinical Specimens Taken from Patients Admitted to Ahvaz Educational Hospitals

Soheila Hasanian[1], Nour AmirMozafari[2], Ahmad Farajzadeh Sheikh[3*], Iraj Mehregan[4]

1- Ph.D of Microbiology.
2- Professor of Medical Microbiology.
3- Professor of Medical Microbiology.
4- Professor of Biology.

1-Department of Microbiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Department of Microbiology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3- Department of Microbiology, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.
4-Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

**Corresponding author:*
Ahmad Farajzadeh Sheikh*; Department of Microbiology, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.*
Tel: +989161133491
Email:
farajzadehah@gmail.com

Abstract

Background and Objective: *Staphylococcus aureus* is one of the few bacteria that can infect all body organs The aim of this study was to compare the reliability of the cefoxitin disk diffusion method with other phenotypic and molecular methods in detection of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). Furthermore, this study was designed to determine the relative prevalence of MRSA and its antibiotic susceptibility in clinical specimens of admitted patients in Ahvaz educational hospitals.

Materials and Methods: A total of 693 *S. aureus* isolates were collected from clinical specimens of Ahvaz hospitals. Detection of MRSA strains was performed using Oxacillin disk diffusion, Oxacillin screening agar, cefoxitin disk diffusion and PCR. The *S. aureus* susceptibility test was also performed by disk diffusion and vancomycin agar screening methods.

Results: 0ut of a total of 693 specimens, 280 specimens were confirmed as S. aureus. A number of MRSA, 121 (43.2%) strains by Oxacillin disk diffusion, 122 (43.5%) strains by Oxacillin screening agar, 123 (43.9%) were identified by cefoxitin disk diffusion and PCR. The results of antibiotic susceptibility pattern showed the highest resistance toward the erythromycin (98.3%), followed by ciprofloxacin(97.5%), clindamycin (94.3%), tetracycline (90.2%), gentamicin (83.7%) and rifampin (41.4%) were noticed. On the other hand, the least resistance was observed against teicoplanin (0%), linzolide (0%), and vancomycin (0%).

Conclusion: The prevalence of MRSA in our region was relatively high, but these strains were totally sensitive to vancomycin, teicoplanin and linzolide antibiotics. Cefoxitin disk test is a reliable method for detection of MRSA strains.

Keyword: Antibiotic resistance, Cefoxitin, MRSA, *Staphylococcus aureus*.

►*Please cite this paper as:*
Hasanian S, AmirMozafari N, Faraj Zadeh Sheikh A, Mehregan I. Comparison of Cefoxitin Disk Disffusion Method with Other Phenotypic and Molecular Methods in Identification of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Clinical Specimens Taken from Patients Admitted to Ahvaz Educational Hospitals. Jundishapur Sci Med J 2020; 19(3):253-266

Received: Sep 16, 2020 **Revised: July 1, 2020** **Accepted: July 12, 2020**